

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-083967
(43)Date of publication of application : 19.03.2003

(51)Int.Cl. G01N 33/53
C12N 15/09
G01N 37/00

(21)Application number : 2001-275251 (71)Applicant : MITSUBISHI RAYON CO LTD
(22)Date of filing : 11.09.2001 (72)Inventor : NAGAHAMA CHIAKI
ITO CHIHO

(54) BIOLOGICALLY RELATED SUBSTANCE FIXED GEL AND BIOLOGICALLY RELATED SUBSTANCE FIXED GEL CHIP HAVING THE GEL HELD THERETO

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a gel composition accelerating the diffusion speed of a biologically related substance being a specimen without lowering the concentration of a gel and easy to form a hybrid, a biologically related substance fixed gel based on the gel composition and a biologically related substance fixed gel chip having the gel held thereto.

SOLUTION: The biologically related substance fixed gel is prepared by fixing the biologically related substance within an aqueous gel containing 3-20 wt.% of an acrylamide type polymer and 0.1-10 wt.% of a polymeric polyhydric alcohol. The biologically related substance fixed gel chip wherein the gel is held to a plurality of sections is also disclosed.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-83967

(P2003-83967A)

(43) 公開日 平成15年3月19日 (2003.3.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
G 0 1 N 33/53	Z N A	G 0 1 N 33/53	Z N A M 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	F

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2001-275251 (P2001-275251)

(22) 出願日 平成13年9月11日 (2001.9.11)

(71) 出願人 000006035

三菱レイヨン株式会社

東京都港区港南一丁目6番41号

(72) 発明者 長浜 千秋

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三

菱レイヨン株式会社化成品開発研究所内

(72) 発明者 伊藤 千穂

広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨ

ン株式会社中央技術研究所内

Fターム (参考) 4B024 AA11 CA04 HA19

(54) 【発明の名称】 生体関連物質固定化ゲル及び該ゲルが保持された生体関連物質固定化ゲルチップ

(57) 【要約】

【課題】 ゲル濃度を下げることなく、検体である生体関連物質が拡散速度を速め、ハイブリッドを形成しやすいゲル組成、並びにこの組成に基づく生体関連物質固定化ゲル及び該ゲルが保持された生体関連物質固定化ゲルチップの提供。

【解決手段】 アクリルアミド系ポリマー3～20重量%及び高分子多価アルコール0.1～10重量%を含む水性ゲル中に生体関連物質が固定化された生体関連物質固定化ゲル及び該ゲルが複数の区画に保持された生体関連物質固定化ゲルチップ。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アクリルアミド系ポリマー 3～20 重量 % 及び高分子多価アルコール 0.1～10 重量 % を含む水性ゲル中に生体関連物質が固定化された生体関連物質固定化ゲル。

一般式 (1) $\text{OH}-[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n\text{H}$

(式中、 n は 10 以上の整数である)

一般式 (2) $\text{OH}-[\text{CH}_2(\text{CH})\text{CH}_3\text{O}]_n\text{H}$

(式中、 n は 10 以上の整数である)

一般式 (3) $\text{ROCH}_2\text{CHORCH}_2\text{OR}$

(式中、 R は $[-\text{CH}_2\text{CHCH}_3\text{O}]_n\text{H}$ を示し、ここで n は 5 以上の整数である)

【請求項 3】 高分子多価アルコールの分子量が 1,000～1,000,000 である請求項 2 記載の生体関連物質固定化ゲル。

【請求項 4】 生体関連物質が核酸である請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の生体関連物質固定化ゲル。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の生体関連物質固定化ゲルが複数の区画に保持された生体関連物質固定化ゲルチップ。

【請求項 6】 複数の区画の各区画の面積が 10^{-6} m^2 以下である請求項 5 記載の生体関連物質固定化ゲルチップ。

【請求項 7】 区画が溝又は貫通孔により形成されている請求項 5 又は 6 記載の生体関連物質固定化ゲルチップ。

【請求項 8】 貫通孔が中空繊維により形成されている請求項 7 記載の生体関連物質固定化ゲルチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、高分子多価アルコールを含む生体関連物質固定化ゲル及びそれを用いた生体関連物質固定化ゲルチップに関する。該チップは、遺伝子発現解析等に使用される。

【0002】

【従来の技術】 近年、各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子の機能については、各種の方法で調べることができる。その有力な方法の一つとして、明らかにされた塩基配列情報を利用した遺伝子発現解析が知られている。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションに代表されるような、各種の核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応や各種の PCR 反応を利用した方法が開発され、当該方法により各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。これらの方法では適用し得る遺伝子の数に制限があるが、今日のゲノムプロジェクトを通して明らかにされつつあるような、一個体レベルという極めて多数の遺伝子の総合的・系統的解析を行うために、多数遺伝子の一括発現解析を

【請求項 2】 高分子多価アルコールが一般式 (1)～(3) で表される化合物からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である請求項 1 記載の生体関連物質固定化ゲル。

可能とする DNA マイクロアレイ法 (DNA チップ法) と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発されてきた。

【0003】 DNA マイクロアレイとしては、リソグラフィ技術を応用して区画化された多数のセル上に DNA 合成を行ったもの (Science 251 767-773)、基盤上に溝又は穴で区画を形成し、該区画の内壁にプローブを固定化したもの (特開平 11-108928 号、特開 2000-78998 号)、チップ上に固定するプローブ量を多くするために、アクリルアミド等のゲルにプローブを固定したマイクロアレイ (USP 5, 770, 721、特開 2000-60554 号) 等、多数の形状物が知られている。本発明者らの一部は、先に新規なマイクロアレイ及びその製造法を開発した (特開 2000-270878 号、特開 2000-270879 号)。該発明は、核酸固定化ゲルを保持する核酸固定化ゲル保持繊維配列体を作製し、この配列体を配列体の繊維軸と交差する方向に切断することにより薄片を得るものである。この薄片は固定化核酸二次元高密度配列体、すなわち DNA マイクロアレイとして使用される。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 アクリルアミド等のゲルにプローブを固定したマイクロアレイは、無孔の基盤上にプローブを固定化するものに比べ、固定の場が 3 次元となるため小面積で多くのプローブが保持できる。しかし、マイクロアレイに作用させる検体となる生体関連物質はゲル内に拡散し、ゲル内部でハイブリッドを形成する必要があり、したがって、検体の検出速度は拡散速度となり、高分子量の検体ほど拡散速度が遅くなるために、検出に時間がかかるという問題があった。

【0005】 このため、ゲルを利用した生体関連物質固定化チップでは、より高分子量の検体のゲル中への拡散速度を上げ、ハイブリッドの形成速度を速め、検出速度を上げることが求められていた。この問題を解消する手段として、ゲル濃度が下げる方法が考えられるが、ゲル濃度を下げすぎるとゲルが柔らかくなり、アクリルアミド濃度 4 % 以下では、ゲルを形成し難い。一方、電気泳

動ゲルの分野では、生体関連物質、例えば、蛋白質、DNA等の移動速度を速めるために、特開平8-15222号のようにアクリルアミド以外のモノマーが提案されているが、ゲル強度、重合速度等からアクリルアミドゲルに匹敵する媒体は開発されていない。

【0006】本発明は、ゲル濃度を下げることなく、検体である生体関連物質が拡散速度を速め、ハイブリッドを形成しやすいゲル組成、並びにこの組成に基づく生体関連物質固定化ゲル及び該ゲルが保持された生体関連物質固定化ゲルチップを提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、特定量のアクリルア

一般式(1) $\text{OH}-[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n\text{H}$

(式中、 n は10以上の整数である)

一般式(2) $\text{OH}-[\text{CH}_2(\text{CH})\text{CH}_3\text{O}]_n\text{H}$

(式中、 n は10以上の整数である)

一般式(3) $\text{ROCH}_2\text{CHORCH}_2\text{OR}$

(式中、 R は $[-\text{CH}_2\text{CHCH}_3\text{O}]_n\text{H}$ を示し、ここで n は5以上の整数

である)

高分子多価アルコールの分子量は、通常、1,000~1,000,000の範囲である。また、生体関連物質としては、核酸が挙げられる。

【0009】さらに、本発明は、上記生体関連物質固定化ゲルが複数の区画に保持された生体関連物質固定化ゲルチップ、である。複数の区画の、各区画の面積は、通常、 10^{-6}m^2 以下である。これら区画は、例えば、溝又は貫通孔により形成され、貫通孔を形成するものとしては、中空繊維を挙げることができる。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明の生体関連物質固定化用ゲルは、アクリルアミド系ポリマー3~20重量%、好ましくは4~15重量%及び高分子多価アルコール0.1~10重量%、好ましくは1~10重量%を含む水性ゲルである。

【0011】アクリルアミド系ポリマーは、(メタ)アクリルアミド及びN-置換(メタ)アクリルアミドの少なくとも1種類の単量体と架橋剤からなる共重合体である。単量体としては、例えば、アクリルアミド、メタクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド等が挙げられる。架橋剤は、これら単量体と共重合可能なものであれば特に限定されない。例えば、電気泳動ゲルなどで一般的に用いられるメチレンビスアクリルアミド、ビスアクリルアミドメチルエーテル、(ポリ)エチレングリコールジ(メタ)アクリレート等が挙げられる。架橋剤の使用量は、単量体に対して1~10重量%が好ましい。

【0012】高分子多価アルコールは、前記一般式

(1)~(3)で表される複数のOH基をもつ化合物で

ミド系ポリマー及び高分子多価アルコールを含むゲルに生体関連物質が保持された生体関連物質固定化ゲルが、従来のゲルと比較して格段に検体である生体関連物質の拡散速度を速め、ゲル内でのハイブリッド形成速度を向上させ得ることを見出し、本発明に至った。

【0008】すなわち、本発明は、アクリルアミド系ポリマー3~20重量%及び高分子多価アルコール0.1~10重量%を含む水性ゲル中に生体関連物質が固定化された生体関連物質固定化ゲル、である。高分子多価アルコールとしては、下記一般式(1)~(3)で表される化合物からなる群から選ばれる少なくとも1種が挙げられる。

ある。例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ヒドロキシメチルセルロース等が挙げられる。これら高分子多価アルコールの分子量は1,000~1,000,000、好ましくは、5,000~100,000である。

【0013】上記ゲルに固定化する対象となる生体関連物質としては、デオキシリボ核酸(DNA)やリボ核酸(RNA)が挙げられる。本発明に用いる生体関連物質は、市販品又は生細胞等から得られた生体関連物質何れでもよい。

【0014】例えば、生体関連物質として核酸を用いる場合には、生細胞からのDNA又はRNAの調製は、公知の方法、例えばDNAの抽出については、Blinらの方法(Nucleic Acids Res. 3, 2303 (1976))等により、また、RNAの抽出については、Favaloroらの方法(Methods. Enzymol. 65, 718 (1980))等により行うことができる。更には、鎖状若しくは環状のプラスミドDNA又は染色体DNAが用いられる。これらのDNAは、制限酵素若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、又は化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。

【0015】本発明では、生体関連物質をそのままゲルに固定化してもよく、また、生体関連物質に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変成させた生体関連物質を固定化してもよい。生体関連物質のゲルへの固定化には、ゲルに物理的に包括する方法や、ゲル構成成分への直接的な結合を利用してもよく、生体関連物質を一旦高分子体や無機粒子などの担体に共有結合あるいは非共

有結合により結合させ、その担体をゲルに固定化してもよい。例えば、生体関連物質の末端基にビニル基を導入し、アクリルアミド等のゲルの構成成分と共重合させることができる(WO98/39351)。

【0016】このようにして作成された生体関連物質固定化ゲルは、例えば、USP 5, 770, 721、特開2000-60554号、特開2000-270878号、特開2000-270879号等に記載のDNAマイクロアレイのプローブを保持するゲルとして使用できる。

【0017】例えば、生体関連物質固定化ゲルチップにおいて、該ゲルを保持する基盤としては、平滑面を有する基盤、複数の溝を有する基盤、複数の貫通穴を有する基盤等が使用できる。例えば、複数の溝又は貫通穴を有する基盤を用いる場合は、溝又は貫通穴によって形成された区画に、重合前又は重合開始直後の生体関連物質固定化ゲルモノマー溶液を添加し区画内でゲル化を実施することにより生体関連物質固定化ゲルチップが作成できる。複数の貫通穴を有する基盤としては、中空繊維の配列体を繊維軸と交差する方向にスライスしたものが例示される(特願平11-93044号)。各区画に保持される生体関連物質の種類は、各々異なってもよいし、グループ化されていてもよい。また、位置決めの指標として、生体関連物質の変わりに例えば、色素が保持されたゲルを区画に保持することも可能である。また、複数の区画の各区画の面積は、通常 10^{-6} m^2 以下である。下限は生体関連物質の検出が可能である限り特に制限されない。

プローブA: cgcgttacct tccgcgagat cagtatccac cga (配列番号1)

オリゴヌクレオチドの合成はPEバイオシステムズ社の自動合成機DNA/RNA synthesizer (model 394)を用いて行い、DNA合成の最終ステップで、アミノリンクII(商標名)(アプライドバイオシステム社)を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端に $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ を導入しアミノ化したプローブを調製した。これらは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。得られたプローブA(1000nmol/ml)10 μl 、1000mMの炭酸ナトリウム水溶液5 μl 及び20 $\mu\text{mol/ml}$ の濃度でDMSOに溶解したメタクリル酸無水物5 μl を混合し、室温で2時間反応させ、ビニル基が導入されたオリゴヌクレオチドプローブを合成した。

【0022】(b)末端ビニル基導入オリゴヌクレオチドのPCR反応

(b-1) 鋳型(染色体)の調製

ロドコッカス ロドクロウ J-1株を栄養培地(グルコース15g、酵母エキス1g、グルタミン酸ナトリウム10g、 KH_2PO_4 0.5g、 K_2HPO_4 0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L、pH 7.2)100mlで30℃、3日培養し、集菌した。

【0018】本発明で得られる生体関連物質固定化ゲル及び該ゲルが多数区画化されたチップは、従来技術で示したゲルチップと全く同様に固定化された生体関連物質をプローブとして、検体と反応させてハイブリダイゼーションを行うことにより、検体中の特定の塩基配列を有する生体関連物質の検出に用いることができる。本発明で言うプローブとは、広義には検体中に存在するタンパク質や低分子化合物等と特異的に結合することができる生体関連物質を指す。すなわち、本発明の生体関連物質固定化ゲルを検体と反応させてハイブリダイゼーションを行い、プローブと相補的な検体中に存在する生体関連物質とハイブリッドを形成させ、このハイブリッドを検出することにより、目的とする検体中の生体関連物質を検出することができる。

【0019】ハイブリッドの検出には、ハイブリッドを特異的に認識することができる公知の手段を用いることができる。例えば、検体となる生体関連物質に蛍光物質を導入し、検体とプローブのハイブリダイゼーション反応量を検体に導入した蛍光強度として検出することが可能である。

【0020】以下、本発明を実施例により更に詳細に説明する。但し、本発明はこれら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

【0021】<参考例1>

(a) ビニル基導入オリゴヌクレオチドプローブの調整
以下に示したオリゴヌクレオチド(プローブA、プローブB)を合成した。

この菌体から染色体を調製し、PCRの鋳型に用いた。なお、ロドコッカス ロドクロウ J-1株はFERMBP-1478として工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されている。

【0023】(b-2) PCR

参考例で作製した末端ビニル化オリゴヌクレオチド(配列番号1)を滅菌水で50 μM 、オリゴヌクレオチド(配列番号2)を滅菌水で5 μM にそれぞれ希釈し、(1)で調製した鋳型を用い、PCR反応を行った。オリゴヌクレオチドはアマシャムファルマシアに合成を依頼した。PCRは、Ex-Taq(宝酒造)の仕様書に従い、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALを用いて行った。反応は100 μl で行い、温度条件は93℃ 30秒、65℃ 30秒、72℃ 1分を35サイクル行った。この反応によって623base(配列番号3)の5'末端ビニル化核酸(プローブC)が増幅された。

【0024】(c) 試料核酸(検体)の調製

(c-1) オリゴヌクレオチドの合成

以下に示したオリゴヌクレオチド(プローブB、プローブC)を合成した。

ブD)を合成した。

プローブA: cgcggttacct tccgcgagatc agtatccac cga (配列番号1)

プローブB: cgcgacaatg gcgagcttgt attcacccag (配列番号2)

オリゴヌクレオチドの合成は(a)と同様に行い、オリゴヌクレオチド(プローブB)の5'末端にCy5を導入した蛍光標識試料核酸のモデルを調製した。これらは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。

【0025】(c-2) PCR

上記記載の5'末端にCy5標識したオリゴヌクレオチド(配列番号2)を滅菌水で50 μ M、オリゴヌクレオチド(配列番号5)を滅菌水で5 μ Mに希釈し、(1)で調製した鋳型とオリゴヌクレオチド(配列番号2、5)を用い、PCR反応を行った。PCR反応は、Ex-Taq(宝酒造)の仕様書に従い、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONA

を用いて行った。反応は100 μ lで行い、オリゴヌクレオチド(配列番号2)温度条件は93 $^{\circ}$ C 30秒、65 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 1分を35サイクル行った。この反応によって623b(配列番号3)の一部(228~623)に相補的な配列である5'末端Cy5標識した一本鎖核酸(395base)が増幅された。

【0026】<実施例1>

(1) 生体関連物質固定化モデルゲルの作製

(1-1) モノマー溶液の調製

表1に示した組成のモノマー溶液を調製した。

【表1】

	ゲル 1
アクリルアミド	7.6重量%
メチレンビスアクリルアミド	0.4重量%
ポリエチレングリコール20000	2.0重量%
過硫酸アンモニウム	0.1重量%
N,N,N',N'-テトラヒドロキシメチレンアミン	0.1重量%
参考例1(b)で調製した末端ビニル化核酸	0.5nmol/ml

【0027】(1-2) ゲルの調製

表1に示したモノマー溶液を調製後直ちに、長さ2cmにカットした1mm ϕ のヘマトクリット管に10 μ l添加して室温で1時間放置し、参考例(a)で得られた末端ビニル基核酸が固定化されたアクリルアミドゲルを作製した。

【0028】(2) ハイブリダイゼーション

表2に示すハイブリダイゼーション溶液を、表3に示すように試料核酸(検体)溶液と混合し、1500 μ l容量のマイクロチューブに(1-2)で作製したモデルゲルを検体溶液中に添加した。60 $^{\circ}$ Cに調節したふらん器に約20時間放置しハイブリダイゼーションを行った。

【表2】

ハイブリダイゼーション溶液組成
10 \times SSC (0.75mol/l塩化ナトリウム、0.075mol/lクエン酸ナトリウム、pH7.0)
10%ブロッキング試薬(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)
0.2%N-ラウロイルザルコシンナトリウム
0.04% SDS(ラウリル硫酸ナトリウム)

【表3】

ハイブリダイゼーション溶液	100 μ l
試料核酸 100pmol/ml溶液	100 μ l
添加ゲル	ゲル1

ヘマトクリット管を取りだし、あらかじめ保温しておいた50mlの0.1 \times SSC、0.1%SDS溶液に移し、振盪しながら45 $^{\circ}$ C、20分間の洗浄を3回行った。

【0030】(4) 検出

洗浄終了後のゲルを、蛍光顕微鏡(オリンパス製蛍光顕微鏡BX60)でcy5用フィルターを用いて観察し、ゲルの深さ方向(即ちヘマトクリット管の長手方向)での蛍光を観察し、冷却CCDカメラ(オリンパス社製C

【0029】(3) 洗浄

ハイブリダイゼーション終了後、マイクロチューブから

OO LSnap) で画像取得した。得られた画像について、ヘマトクリット管の長手方向での蛍光強度のラインプロファイル画像解析ソフトImage-Pro Plus (プラネトン社製) で測定し、ゲル表面からの蛍光強度の積分値を測定した。

<比較例1>実施例1のモノマー溶液組成のうち、ポリ

	実施例1	比較例1
蛍光強度の積分値 *	8240	3960

*) 蛍光強度の積分値が高いほど、ハイブリッドを形成した量が多いことを示す。

【0032】<参考例2>

(a) ビニル基導入オリゴヌクレオチドプローブの調整, (b) 末端ビニル基導入オリゴヌクレオチドのPCR

プローブA: cgcgttacct tccgcgagat cagtatccac cga (配列番号1)

プローブC: gactcggggc tgatcagcga agatgagatc (配列番号4)

オリゴヌクレオチドの合成はPEバイオシステムズ社の自動合成機DNA/RNA synthesizer (model 394) を用いて行った。オリゴヌクレオチド (プローブC) については5' 末端にCy5を導入した蛍光標識試料核酸のモデルを調製した。これらは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。

(c-2) PCR

C-1記載の5' 末端にCy5標識したオリゴヌクレオチド (配列番号2) を滅菌水で50 μ M、オリゴヌクレオチド (配列番号1) を滅菌水で5 μ Mに希釈し、

(1) で調製した鋳型とオリゴヌクレオチド (配列番号1、2) を用い、PCR反応を行った。PCR反応は、Ex-Taq (宝酒造) の仕様書に従い、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALを用いて行った。反応は100 μ lで行い、オリゴヌクレオチド (配列番号2) 温度条件は93℃ 30秒、65℃ 30秒、72℃ 1分を35サイクル行った。この反応によって623b (配列番号3) の一部

エチレングリコール20000を抜いた以外は、同様にゲルの調製、ハイブリダイゼーション、検出を行った。結果を表4に示した。

【0031】

【表4】

R反応 は参考例1と同様に行った。

(c) 試料核酸 (検体) の調製

(c-1) オリゴヌクレオチドの合成

以下に示したオリゴヌクレオチド (プローブB、プローブD) を合成した。

プローブA: cgcgttacct tccgcgagat cagtatccac cga (配列番号1)

プローブC: gactcggggc tgatcagcga agatgagatc (配列番号4)

(420~623) に相補的な配列である5' 末端Cy5標識した一本鎖核酸 (203base) が増幅された。

【0033】<実施例2>

(1) 繊維配列体の調製

1cm² 四方に縦横各々5個、合計25個の孔が規則正しく正方位列された繊維ガイド板2枚を用い、繊維ガイド板の中心部のたて5列、横5列にナイロン製中空繊維 (外径約300 μ m、長さ約50cm) 計25本を通過させることにより中空繊維配列体を得た。2枚の繊維ガイド板の間隔を20cmとし、ポリウレタン樹脂 (日本ポリウレタン工業(株)コロネー4403、ニッポラン4223) を流しこみ、硬化させることにより、両端に樹脂で固定化されない部分を有する中空繊維配列体を得た。

【0034】(2) 中空繊維配列体への生体高分子の導入及び固定化

参考例2において合成したを含む、以下の組成からなるモノマー溶液3、4を作製した。

【表5】

	モノマー溶液組成
アクリルアミド	7.6重量%
メチレンビスアクリルアミド	0.4重量%
ポリエチレングリコール20000	2.0重量%
2,2'-アゾビス (2-アミジノプロパン) 二塩酸塩	0.1重量%
参考例2 (b) で調製した末端ビニル化核酸	0.5nmol/ml

【0035】モノマー溶液3またはモノマー溶液4を、中空繊維配列体の中空繊維の中空部に注入した後、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、80℃にて4時間放置することにより重合反応を行った。その結果、末端ビニル化核酸が固定化されたゲルを内部に保持する中空繊維配列体を得た。

【0036】(3) 生体高分子配列薄片の作製:

(2) で得られた末端ビニル化核酸固定化中空繊維配列体、各々の繊維軸に直角方向に、マイクロームを用いて約500 μ mの厚さに薄片を切り出すことにより、末端ビニル化核酸が規則的に配列された生体高分子配列薄片を得た。

【0037】(4) ハイブリダイゼーション
ハイブリパック (NIPPON GENETICS CO.LTD製) に表 5
に示すハイブリダイゼーション溶液を 100 μ l 添加
し、(3) で作製した生体高分子配列薄片をハイブリダ
イゼーション溶液中に添加して、熱シールをした。65

℃に調節したふらん器に約20時間放置し、ハイブリダ
イゼーションを行った。

【0038】

【表6】

ハイブリダイゼーション溶液組成	
5×SSC	
(0.375mol/l塩化ナトリウム、0.0375mol/lクエン酸ナトリウム、pH7.0)	
0.5% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)	
10 pmol/ml 試料核酸	(参考例2(c)で調製した試料)

(5) 洗浄

ハイブリダイゼーション終了後、ハイブリパックから生

体高分子配列薄片をとりだし、以下の洗浄操作を行っ
た。

- ① 2×SSC, 0.1% SDS 室温 20分
- ② 0.2×SSC, 0.1% SDS 55℃ 20分
- ③ 0.2×SSC, 0.1% SDS 55℃ 20分
- ④ 0.02×SSC 室温 5分
- ⑤ 0.02×SSC 室温 5分

【0039】(6) 検出

洗浄終了後の薄片を、蛍光顕微鏡 (オリンパス製蛍光顕
微鏡BX60) でcy5用フィルターを用いて観察し、
冷却CCDカメラ (オリンパス社製COOLSnap)
で画像取得した。露光時間は15秒とした。得られた画
像について、末端ビニル化核酸が固定化されているスポ
ット内の蛍光強度の平均値を算出した。画像解析は、画
像解析ソフトImage-ProPlus (プラネトロ
ン社製) で行った。結果を表6に示した。

20

【0040】<比較例2>実施例2のモノマー溶液組成
のうち、ポリエチレングリコール20000を抜いてた
以外は、同様に中空繊維配列体への生体高分子の導入及
び固定化、生体高分子配列薄片の作製、ハイブリダイゼ
ーション、洗浄、検出を行った。実施例2、比較例2の
検出結果を表6に示した。

【0041】

【表7】

	実施例2	比較例2
スポット内の蛍光強度の平均値	8525	3580

【0042】

【発明の効果】本発明のゲル組成は、高分子多価アルコ
ールが添加されていないゲルと比較して検体とプローブ
とのハイブリッド形成量が高い。すなわち、ハイブリッ

ドを形成する速度を向上させることが可能である。

【0043】

【配列表】

<110> Mitsubishi Rayon Co., Ltd.

<120> Bio-related material-fixed gel and bio-related material-fixed gel
chip holding said gel

<130>

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Synthetic DNA

<400> 1

cgcgttacct tccgcgagat cagtatccac cga

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

13

14

<213> Artificial Sequence

<223> Synthetic DNA

<400> 2

cgcgacaatg gcgagcttgt attcaccgag

<210> 3

<211> 623

<212> DNA

<213> Rhodococcus rhodochrous

<400> 3

```

gcgatagggtg gaggtcaggg tttgggacag cagctccgaa atccgctaca tcgtcatccc 60
ggaacggccg gccggcaccg acggttggtc cgaggaggag ctgacgaagc tggtagaccg 120
ggactcgatg atcgggtgtca gtaatgcgct cacaccgcag gaagtgatcg tatgagtga 180
gacacactca ctgatcggct cccggcgact gggaccgccg caccgccccg cgacaatggc 240
gagcttgtat tcaccgagcc ttgggaagca acggcattcg gggtcgccat cgcgctttcg 300
gatcagaagt cgtacgaatg ggagttcttc cgacagcgtc tcattcactc cactcgtgag 360
gccaacgggtt gcgaggcata ctacgagagc tggacaaagg cgctcgaggc cagcgtggtc 420
gactcggggc tgatcagcga agatgagatc cgcgagcgca tggaatcgat ggccatcatt 480
gactgacatc ccctgtgtct ccatttagca gcagtgcggg cgtaccccca cggtgctgag 540
ccgacggggg acgcccgcac ttcatcaatg acggtggttc ctaatttggc tcggtggata 600
ctgatctcgc ggaaggtaac gcg 623

```

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<214> Artificial Sequence

<223> Synthetic DNA

<400> 4

gactcggggc tgatcagcga agatgagatc

【0044】

【配列表フリーテキスト】

配列番号1：合成DNA

配列番号2：合成DNA

配列番号4：合成DNA

30

40